

삼채의 조추출물과 유기용매 분획물에 대한 항산화 및 항염증 효과

이용범 · 함영민 · 윤선아 · 오대주 · 송상목 · 홍인철 · 이시택 · 현호봉 · 김창숙 · 윤원종

(재)제주테크노파크 생물종다양성연구소

Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Crude Extract and Solvent Fractions of *Allium hookeri*

Yong-Bum Lee, Young-Min Ham, Seon-A Yoon, Dae-Ju Oh, Sang-Mok Song, In-Choel Hong, Si Taek Lee, Ho Bong Hyun, Chang-Suk Kim, and Weon-Jong Yoon

Jeju Biodiversity Research Institute (JBRI), Jeju Technopark (JTP)

ABSTRACT This study describes the preliminary evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of *Allium hookeri*. *A. hookeri* was extracted using crude extract and then fractionated sequentially with *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, and *n*-BuOH. To screen for antioxidant and anti-inflammatory agents effectively, we first examined the inhibitory effect of *A. hookeri* extracts on production of oxidant stresses (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, xanthine oxidase, and superoxide). In addition, we examined the inhibitory effects of *A. hookeri* on production of pro-inflammatory factors (nitric oxide, prostaglandin E₂, inducible nitric oxide synthase, and cyclooxygenase-2) in murine macrophage RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide. Of the sequential solvent fractions of *A. hookeri*, EtOAc fractions showed decreased production of oxidant stresses, and CH₂Cl₂ and EtOAc fractions of *A. hookeri* inhibited production of pro-inflammatory factors. EtOAc fraction inhibited production of pro-inflammatory cytokines (interleukin-6 and -1β). These results suggest that *A. hookeri* has significant effects on oxidant stresses and pro-inflammatory factors and is a possible antioxidant and anti-inflammatory therapeutic and preventive material.

Key words: *Allium hookeri*, pro-inflammatory factors, pro-inflammatory cytokines, lipopolysaccharide, RAW 264.7 cells

서 론

산소는 생물에게 없어서는 안 되는 요소이지만 식물 또는 동물의 세포 등과 같은 여러 유기물질에 대해 산화 반응을 유발시켜 많은 부작용을 나타내게 되는 양면성을 가지고 있다(1). 생체 내에서 필요한 에너지 공급을 위해 생화학적 산화반응은 끊임없이 일어나며 이 과정에서 발생하는 흔히 유해산소라 불리는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 가장 안정한 형태의 산소인 삼중항산소(³O₂)가 산화, 환원과정에서 생성되는 초과산화물인 superoxide(¹O₂⁻), hydroxy 라디칼(·OH)과 같은 짝짓지 않은 상태의 free radical과 과산화수소수(H₂O₂)를 통칭한다(2). 생체 내 ROS의 형성이 증가한 상태인 산화적 스트레스에 의해 세포 내 구성 성분인 단백질, 지질 및 DNA 성분이 기능적으로 손상되어 생체기능을 저하시키며, 다양한 질환의 원인으로 보고되고 있다(3,4). 이로 인하여 발생할 수 있는 피해를 줄이기 위하여 천연 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행 중이다. 현재

butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT)과 같은 합성 항산화제는 탁월한 효과와 경제성 때문에 많이 사용되고 있지만 인체에 대한 안전성 문제로 α-tocopherol, vitamin C, flavonoid, carotenoid 등과 같은 천연 항산화제에 관심이 쏠리고 있다. 이러한 천연 항산화제는 합성 항산화제보다 안전하고 효과가 뛰어나지만, 가격이 비싼 단점을 갖고 있어 경제성을 갖는 천연물 소재를 찾으려는 노력이 활발히 이루어지고 있다(5-7).

염증반응은 상처나 감염, 또는 자가 면역 기전 등에 의해 나타나는 생체 반응으로서, 조직의 혈관확장에 의한 부종, 발열, 조직손상, 세포증식 등을 특징으로 하는 생체반응이다(8). 염증반응에 관여하는 대표적인 세포 중 하나인 대식세포는 염증성 매개물질은 interleukin(IL)-6, IL-1β, tumor necrosis factor-α(TNF-α) 등과 같은 pro-inflammatory cytokine과 nitric oxide(NO), inducible nitric oxide synthase(iNOS), prostaglandin E₂(PGE₂) 등의 염증유발인자들을 생성한다(9). 정상적인 NO는 세균을 죽이거나 종양을 제거하는 중요한 역할을 하지만 외부요인에 의한 과도한 NO의 생성은 염증을 유발시켜 신경 손상, 조직 손상 및 유전자 변이를 일으키는 것으로 알려져 있다(10). 이러한 염증반

음이 만성적으로 일어날 때는 염증매개 물질이 과도하게 분비되어 암세포의 성장을 촉진시키고, 인슐린 저항성을 증가시키며 동맥경화를 악화시키는 등 다양한 병리학적 기전에 관여한다고 보고되어 있다(11,12). 따라서 염증매개체의 활성을 직접 억제하는 물질에 관한 관심이 높아지고 있지만 최근에는 합성항염증 치료제로 인한 부작용의 우려가 커지고 있다(13). 그러므로 이러한 치료제를 대체할 수 있는 더욱 안전한 천연 항산화제 및 천연 항염증제의 개발이 요구되고 있어 그에 따라 항산화 및 항염증에 대해 안전하고 효과가 좋은 천연물 중심의 연구가 활발히 진행되고 있다(14,15).

삼채(*Allium hookeri*)는 숲, 습지, 해발 1,400~4,200 m의 초원지대에 자생하며 동아시아의 중국 남부, 인도, 부탄, 스리랑카 등에 분포하고 있는 파속 식물로 뿌리, 잎 및 꽃모두 식용이 가능하며 고대 중국인들은 식용과 약용으로 사용해오고 있는 식물이며 단백질, 당, 섬유소, ascorbic acid, phytosterol, total phenol 등이 양파보다 많이 함유되어 있어 양파 대체양념으로 널리 사용되는 의학식품(medical food)이다(16). 파, 마늘, 양파 등 *Allium* 속 식물은 유효화합물을 많이 포함하여 항당뇨, 항산화, 항염 및 항균 등의 활성이 있는 것으로 보고되어 있으나, 삼채의 생리활성에 관한 연구는 여전히 미흡한 실정이다(17-19).

재료 및 방법

재료

충청북도에서 재배되고 있는 삼채(*Allium hookeri*) 원물을 2015년 7월에 구입하여 사용하였고, 확보한 시료는 증류수로 2~3회 수세한 후 물기를 제거하여 열풍건조 한 다음 마쇄기로 갈아 미세말로 하여 추출용 시료로 사용하였다.

용매 계통 분획

삼채 조추출물 및 유기용매 분획물의 제조는 70% 주정에 에탄올(EtOH) 및 분획용 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 에틸아세테이트(EtOAc) 그리고 부탄올(*n*-BuOH)을 사용하여 용매의 극성을 이용한 순차적 추출법을 사용하였다. 즉 건조된 분말 시료에 70% 주정 에탄올로 2회 반복 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 동결건조기로 완전히 건조시켜 조추출물을 제작하였고 건조된 조추출물에 10배량의 증류수와 동량의 헥산을 첨가하여 분획한 후 감압 농축하여 헥산 분획물을 얻었으며, 같은 방법으로 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물 층을 분획하여 각각의 순차 분획물을 얻었고 모든 과정은 2회 반복 시행하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성에 의한 항산화 활성 검색

항산화 활성은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 시료의 라디칼 소거 효과(radical scavenging effect)를 측정

하는 Blois법(20)을 활용하였다. DPPH 약 2 mg을 EtOH 15 mL에 녹여 DPPH 용액을 제조하였다. 이 용액 12 mL에 dimethyl sulfoxide(DMSO) 6.25 mL를 첨가한 후, 517 nm의 파장에서 대조군의 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 EtOH로 희석하여 10초간 진탕시켰다. 그리고 용매 1 mL에 분말로 추출된 시료 1 mg을 섞은 후 충분히 녹이고, 준비된 DPPH 450 μL 에 시료용액 50 μL 를 넣어 섞은 다음 실온에서 15분간 방치하였다가 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성 검색

Xanthine/xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도에 의해 측정하였고, superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium(NBT) 환원방법에 의해 측정하였다(21,22). 반응액으로는 농도별 시료(15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 0.5 mM xanthine과 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer(pH 7.5) 100 μL 에 혼합하여 준비하였고, 50 mU/mL xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였다. Superoxide 소거 활성은 위 반응액에 0.5 mM NBT를 첨가하여 반응시켰다. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC_{50})로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복하여 실험을 시행하여 평균값을 구하였다.

세포 배양

Murine macrophage cell line RAW 264.7 세포를 KCLB (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)로부터 분양받아 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다. Lipopolysaccharide(LPS, *E. coli* serotype 0111:B4)를 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다.

NO assay

RAW 264.7 세포(1.5×10^5 cells/mL)를 DMEM 배지를 이용하여 24 well plate에 접종하고, 시험물질과 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μL 와 Griess 시약[1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphthylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid] 100 μL 를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 sodium nitrite(NaNO_2)를 연속 희석하여 얻었다.

세포독성 평가(LDH assay)

RAW 264.7 세포(1.5×10^5 cells/mL)를 DMEM 배지에 시험 약물과 LPS($1 \mu\text{g/mL}$)를 동시에 처리하여 24시간 배양한 후 배양 배지를 얻어 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. Lactate dehydrogenase(LDH) 활성을 non-radioactive cytotoxicity assay kit(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심분리하여 얻은 배양 배지 50 μL 와 reconstituted substrate mix 50 μL 를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50 μL 의 stop solution을 넣어 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군(LDH control, 1:5,000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

PGE₂ 생성 억제 효능 평가

RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 전 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도(1 mg/mL)로 조제된 시험물질 50 μL 와 450 μL 의 LPS 최종농도($1 \mu\text{g/mL}$)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일한 조건에서 배양하였다. 24시간 후 PGE₂를 측정하기 위해 배양 배지를 12,000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액을 얻었다. PGE₂의 정량은 PGE₂ ELISA kit(R&D System, Inc., Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

Immuno blot analysis

RAW 264.7 세포(1.0×10^6 cells/mL)를 DMEM 배지를 이용하여 6 well plate에 접종한 후 18시간 전 배양을 하고, LPS($1 \mu\text{g/mL}$)로 자극을 주고 시료($50 \mu\text{g/mL}$)를 동시에 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포를 2~3회 phosphate buffered saline으로 세척 후 300 μL 의 lysis buffer를 첨가, 30분~1시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리(15,000 rpm, 15 min) 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준화하여 Bio-Rad Protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Quarry Bay, Hong Kong)을 사용하여 정량하였다. 20~30 μg 의 lysate를 8% mini gell sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis로 변성 분리하여, 이를 polyvinylidene difluoride membrane(Novex, Kiryat Shmona, Israel)에 200 mA로 2시간 동안 transfer 하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skin milk가 함유된 TTBS(TBS+0.1% Tween 20) 용액으로 상온에서 2시간 동안 실시하였다. iNOS와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현량을 측정하기 위해 1차 항체로서 anti-mouse iNOS(Calbiochem, La Jolla, CA, USA)와 anti-goat COX-2(BD Biosciences,

San Jose, CA, USA)를 TTBS 용액에서 희석(1:1,000)하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 horse radish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 1:5,000으로 희석하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, TTBS로 4회 세정하여 ECL 기질(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

염증성 사이토카인(IL-6, IL-1 β 및 TNF- α) 생성 억제 효능 평가

RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 전 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 RAW 264.7 세포는 10배 농도로 조제된 추출물 시료 50 μL 와 450 μL 의 LPS($1 \mu\text{g/mL}$)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하였고 전 배양과 같은 조건에서 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3 min) 하여 얻어진 상층액의 pro-inflammatory cytokines 생성 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 -20°C 이하에 보관하였다. Pro-inflammatory cytokines 정량은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D System Inc.)을 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험 결과는 각 항목에 따라 평균±표준편차(SD)를 구하여 신뢰수준 95%($P < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결과 및 고찰

에탄올 추출물 및 유기용매 분획물의 수율

삼재 미세말 시료 300 g을 70% 주정 에탄올(EtOH)로 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 조추출물 91 g(30.3%)을 얻었다. 그리고 여기서 얻어진 조추출물(90 g)을 10배량의 증류수로 현탁시킨 후에 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄, 에틸아세테이트 그리고 부탄올 등을 순차적으로 분획하여 헥산 분획물에서 2.96 g(3.28%), 디클로로메탄 분획물에서 1.28 g(1.42%), 에틸아세테이트 분획물에서 0.53 g(0.58%), 부탄올 분획물에서 8.16 g(9.06%) 및 잔사인 물 분획물에서 76.93 g(85.47%)을 얻었다. 삼재 조추출물에 대한 각 순차 분획물 중 에틸아세테이트 분획물 수율이 0.58%로 가장 낮았고, 물 분획물이 85.47%로 가장 높은 수율을 보였다.

DPPH 라디칼 소거 활성

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는

Table 1. Comparison of antioxidant potential on 70% EtOH extract and solvent fractions of *Allium hookeri*

Treatment	IC ₅₀ ¹⁾ (µg/mL)		
	DPPH radical scavenging activity	Xanthine oxidase inhibitory activity	Superoxide radical scavenging activity
70% EtOH	>1,000	>1,000	>1,000
<i>n</i> -Hexane	981.80±1.08	>1,000	489.40±7.93
CH ₂ Cl ₂	377.40±0.51	>1,000	>1,000
EtOAc	202.00±0.50	400.80±3.22	>1,000
<i>n</i> -BuOH	>1,000	>1,000	>1,000
H ₂ O	>1,000	>1,000	>1,000

¹⁾IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments. Values are the mean±SD of triplicate experiments.

것으로 유리기 소거 작용은 활성라디칼(free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다. DPPH는 안정한 유리기로 cysteine, glutathione과 같은 황함유 아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine(*p*-phenylenediamine, *p*-aminophenol) 등에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화 물질의 항산화능 측정에 많이 이용되고 있다. 삼채의 조추출물과 유기용매 분획물의 실험 결과 큰 라디칼 소거 활성을 보이지는 않았으나, 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 라디칼 소거 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물의 IC₅₀ 값은 377.4 µg/mL와 202.0 µg/mL로 각각 나타났다(Table 1).

Xanthine oxidase 억제

Xanthine oxidase는 산화적 환경에서 xanthine dehydrogenase로부터 생성된다. Xanthine oxidase는 hypoxanthine을 산화시켜 최종적으로 uric acid와 산소를 생성하며 산소유리기와 수소과산화기가 이 산소로부터 발생하게 된다. Uric acid의 축적은 고요산혈증과 통풍을 유발시키며 uric acid 형성의 억제제가 이들 질환을 위한 치료 물질로서 유용할 것이다. 게다가 xanthine oxidase에 의해 생성된 산소유리기는 세포의 손상을 초래한다(21). 삼채의 조추출물과 유기용매 분획물의 xanthine oxidase 활성 억제에 대한 결과는 DPPH 활성 라디칼 소거 활성에서 제일 뛰어났던 에틸아세테이트 분획물에서 약간의 xanthine oxidase 생성 억제 활성을 나타냈으며 IC₅₀ 값은 400.8 µg/mL로 나타났다(Table 1).

Superoxide 라디칼 소거 활성

정상적인 산화적 인산화의 과정 동안 소모되는 전체 산소의 0.4~4% 정도는 free radical superoxide($\cdot\text{O}_2^-$)로 전환되며 생성된 $\cdot\text{O}_2^-$ 는 다른 ROS로 전환되어 직접적 또는 간접적으로 세포 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 정상적으로는 $\cdot\text{O}_2^-$ 는 내인성 항산화 방어기전에 의해 superoxide dismutase(SOD)에 의해 빠르게 과산화수소로 전환된다(23). 그러나 이 내인성 항산화 방어체계가 세포 내 산화-환원 균형을 유지하는 데 문제가 생길 경우 결과적으로 산화스

트레스가 일어나게 되며 이 산화스트레스는 직접 세포 내 거대분자의 손상을 일으키거나 세포 손상을 일으키는 데 중요한 역할을 한다(24). 따라서 산소 유리기의 자유기를 소거할 수 있는 물질 또한 산화적 손상의 예방에 유용할 것으로 생각한다. Superoxide 라디칼 소거 활성에 대한 결과는 핵산 분획물에서 약간의 superoxide radical 소거 활성을 나타냈으며 IC₅₀ 값은 489.4 µg/mL로 나타났다(Table 1).

세포독성에 미치는 영향

LDH는 모든 세포의 세포질 안에 존재하는 효소로서 pyruvic acid와 lactic acid 간의 가역적 전환에 관여하여 촉매 작용을 하며, LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액 중으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승한다. RAW 264.7 세포에 시험약물과 LPS(1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 LDH assay 방법을 이용하여 세포독성을 확인한 결과, 삼채의 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물인 경우 200 µg/mL 이상의 농도에서 다소 세포독성이 관찰되었으나 다른 유기용매 분획물에서는 세포독성이 나타나지 않았고 100 µg/mL 농도 이하에서는 조추출물 및 유기용매 분획물에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1)

NO 생성 억제 효과

활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 삼채 추출물과 분획물의 효과를 알아보았다. 생성된 NO 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 실험 결과 삼채 조추출물과 물 분획물을 제외한 유기용매 분획물에서 NO 생성 억제 효과를 보였으며, 그중 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 대조군인 LPS 단독처리군에 비해 NO 생성 억제 효과를 관찰할 수 있었고 가장 활성이 높은 디클로로메탄 분획물의 경우 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

PGE₂ 생성에 미치는 영향

염증단계에 중추적 역할을 하는 cytokine인 IL-1β와 IL-6의 발현을 저해시키거나 COX-2 활성 저해에 기인하는

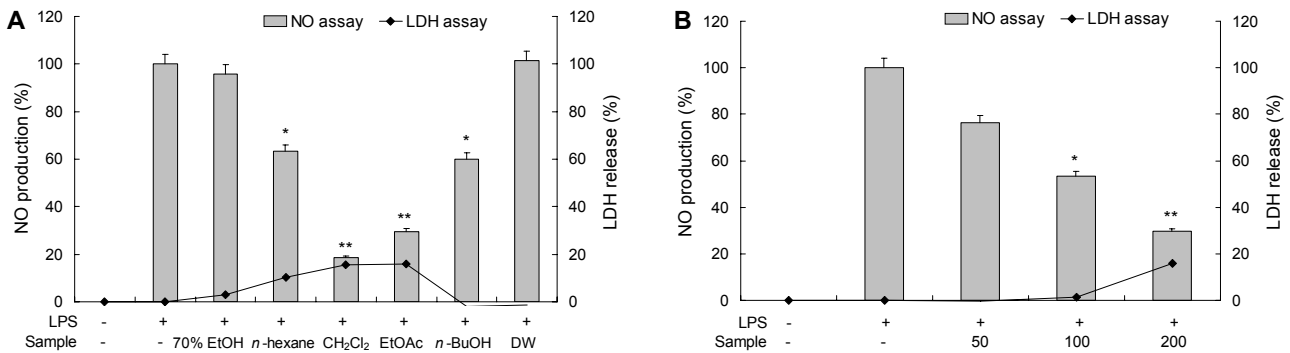


Fig. 1. Inhibitory effect of 70% EtOH and solvent fractions of *A. hookeri* on cell viability and nitric oxide production in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h in the presence of the 70% EtOH extract and solvent fractions of *A. hookeri* (200 μ g/mL). Cytotoxicity was determined using the LDH method. Values are the mean \pm SD of triplicate experiments. * P <0.05, ** P <0.01. A: effect on 70% EtOH extract and solvent fractions of *A. hookeri*, B: effect on CH₂Cl₂ solvent fractions of *A. hookeri*.

PGE₂의 생성 억제제를 통해 pro-inflammatory factor의 증가를 수반하는 병변 과정을 조절할 수 있을 가능성이 높다 (25,26). RAW 264.7 세포에서 염증성 인자인 PGE₂ 억제 효과를 ELISA kit을 이용하여 정량하였다. 그 결과 PGE₂ 생성 억제제는 조추출물과 물 분획물을 제외한 유기용매 분획물에서 PGE₂ 생성 억제 효과를 보였으며 LPS에 의해 발현되는 PGE₂ 생성 억제에 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었고 디클로로메탄 분획물의 경우 농도 의존적으로 PGE₂ 생성 억제 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

iNOS와 COX-2 생성에 미치는 영향

iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진할 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(27,28). RAW 264.7 세포에 LPS (1 μ g/mL)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 삼채 추출

물과 분획물을 처리하여 단백질 생성에 대한 억제 정도를 immuno blot analysis를 통해 알아보았다. 그 결과 단백질 수준에서도 조추출물과 물 분획물을 제외한 유기용매 분획물에서 좋은 억제 효과를 보였으며, 그중 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 대조군인 LPS 단독처리 군보다 강한 억제 효과를 나타내었고 디클로로메탄 분획물의 경우 농도 의존적으로 iNOS 생성 억제 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과 NO의 생성 억제가 iNOS 발현 억제를 통한 것으로 여겨진다.

다수의 염증 억제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억제를 나타내며 이는 COX-2의 생성 및 활성 저해에 의한 것이다. COX는 COX-1과 COX-2로 나누어지는데 다양한 세포에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 prostaglandin의 합성에 작용하며, 상대적으로 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 부위에서 발현된다(29,30). 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨진다. RAW 264.7 세포에 LPS(1 μ g/mL)로 자극을 주고 삼채 조추출물과 유기용매 분획물을 처리하여



Fig. 2. Inhibitory effects of 70% EtOH extract and solvent fractions of *A. hookeri* on PGE₂ production in RAW 264.7 cells. Cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS (1 μ g/mL) for 24 h in the presence of 70% EtOH extract and solvent fractions from *A. hookeri* (200 μ g/mL). Supernatants were collected, and the PGE₂ concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SD of triplicate experiments. * P <0.05, ** P <0.01. A: effect on 70% EtOH extract and solvent fractions of *A. hookeri*, B: effect on CH₂Cl₂ solvent fractions of *A. hookeri*.

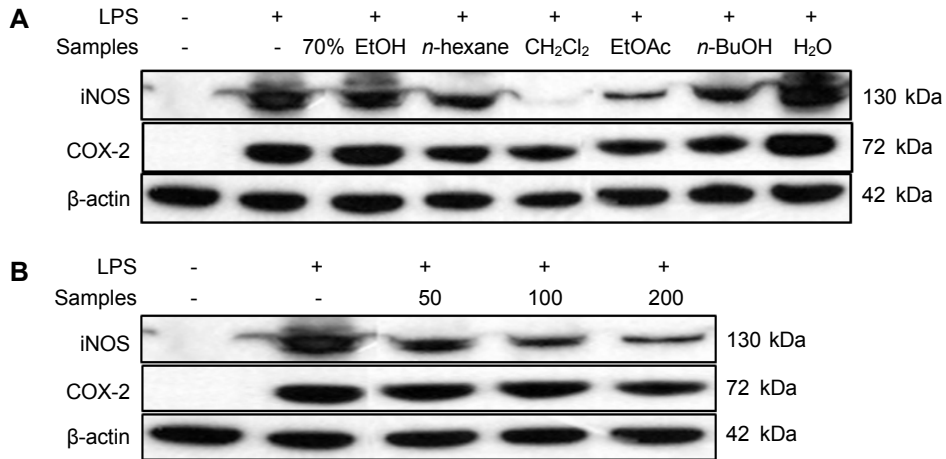


Fig. 3. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions of *A. hookeri* on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and the cells were stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of 70% EtOH extract and solvent fractions of *A. hookeri* (200 µg/mL) for 24 h. iNOS and COX-2 protein levels were determined using immunoblotting method. A: effect on 70% EtOH extract and solvent fractions of *A. hookeri*, B: effect on CH₂Cl₂ solvent fractions of *A. hookeri*.

확인한 결과 조추출물과 물 분획물을 제외한 나머지 분획물에서 억제 효과를 나타내었고 디클로로메탄 분획물의 경우 COX-2 생성 억제 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

Pro-inflammatory cytokine 생성 억제 효과

Pro-inflammatory cytokines은 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 병변 과정에서 그 발현 정도가 증가하며, 압축된 과정에서 일어나는 피부염증에 중요한 역할을 한다.

Tumor TNF-α, IL-1β, 그리고 IL-6 등과 같은 cytokines은 인간의 염증성 피부질환과 관련이 있음은 이미 많이 보고 되어 왔다. 또한, 여러 염증질환과 알레르기 현상에 cytokines에 대한 항체를 처리하였을 때 증상이 완화되었다(31, 32). 대식세포인 RAW 264.7 세포로부터 pro-inflammatory cytokine의 생성 억제 정도를 확인한 결과 디클로로메탄 분획물에서 IL-6와 IL-1β의 생성이 농도 의존적으로 억제하는 것을 관찰하였으나 TNF-α의 생성을 억제하지 못하는 것을 확인할 수 있었고, 이는 LPS를 처리하지 않고 삼체

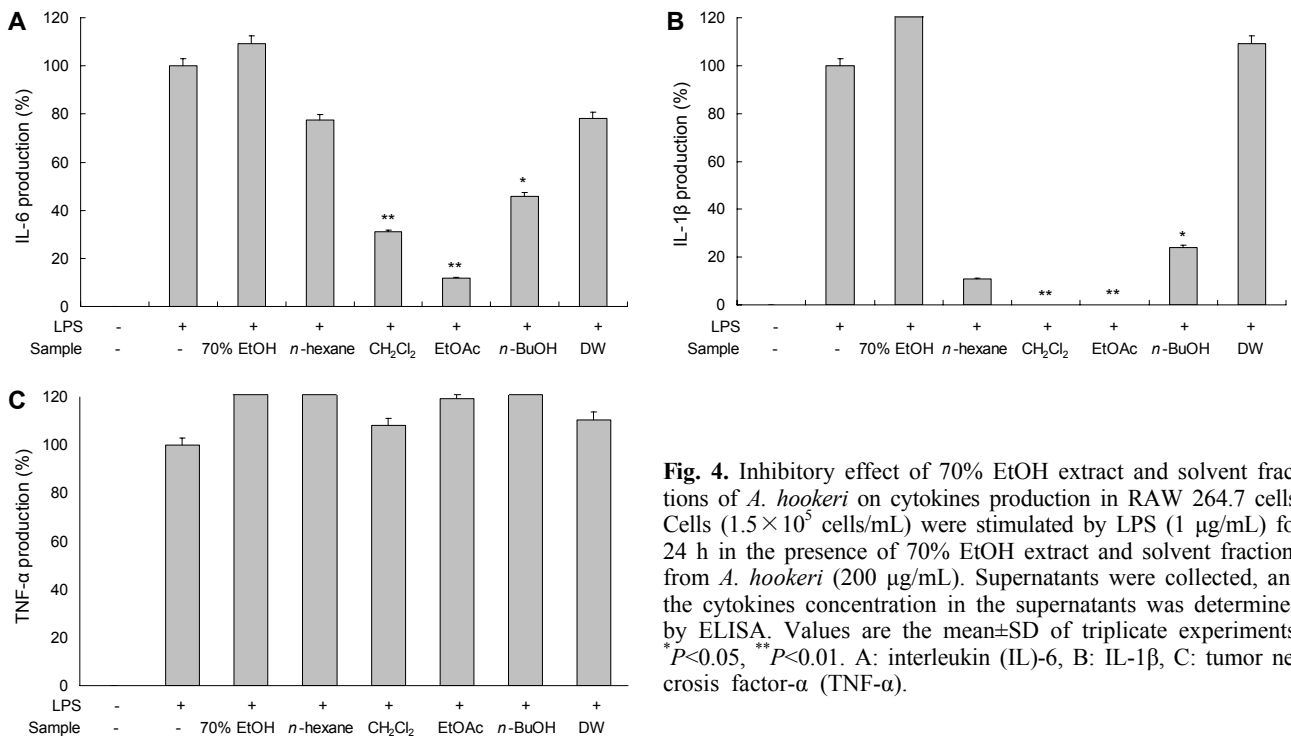


Fig. 4. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions of *A. hookeri* on cytokines production in RAW 264.7 cells. Cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of 70% EtOH extract and solvent fractions from *A. hookeri* (200 µg/mL). Supernatants were collected, and the cytokines concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean±SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. A: interleukin (IL)-6, B: IL-1β, C: tumor necrosis factor-α (TNF-α).

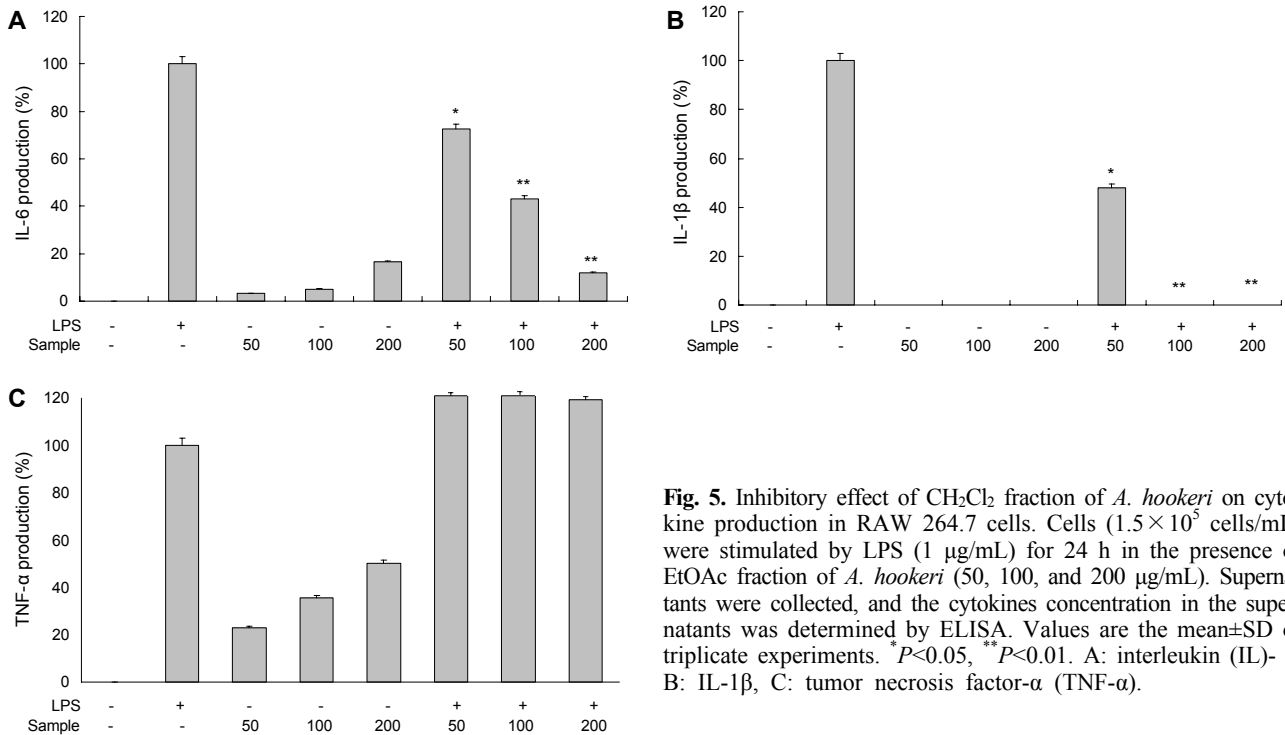


Fig. 5. Inhibitory effect of CH_2Cl_2 fraction of *A. hookeri* on cytokine production in RAW 264.7 cells. Cells (1.5×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 24 h in the presence of EtOAc fraction of *A. hookeri* (50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$). Supernatants were collected, and the cytokines concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. A: interleukin (IL)- 6, B: IL-1 β , C: tumor necrosis factor- α (TNF- α).

디클로로메탄 분획물을 농도별로 처리하였을 때 TNF- α 의 생성이 농도 의존적으로 증가하였기 때문으로 보인다(Fig. 4, Fig. 5).

요 약

본 연구는 삼채의 조추출물과 유기용매 분획물들을 가지고 DPPH 라디칼 소거 활성에 의한 항산화 활성 검색 결과 디클로로메탄(CH_2Cl_2) 분획물과 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물에서 라디칼 소거 활성을 나타냈으며, xanthine oxidase 억제 효과는 DPPH 활성 라디칼 소거 활성에서 제일 뛰어났던 에틸아세테이트 분획물에서, superoxide 소거 활성은 헥산(*n*-hexane) 분획물에서 활성이 나타났다. RAW 264.7 세포에 lipopolysaccharide로 자극을 주고 삼채 주정 추출물 및 유기용매 분획물들을 처리하여 확인해본 결과, 조추출물과 물 분획물을 제외한 나머지 유기용매 분획물에서 염증 유발 인자(NO, PGE₂, iNOS, COX-2, IL-6 및 IL-1 β) 생성 억제 효과가 나타났으며, 그중 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 억제 효과를 확인할 수 있었다. 본 실험 결과 삼채 조추출물과 유기용매 분획물에서 항산화 효과 및 염증 유발 인자의 생성 억제 효과가 나타났으며, 이러한 결과 삼채에서 유효성분 추출을 통한 항산화, 항염증 물질의 연구 또는 예방하거나 치료할 수 있는 염증 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(농림축산식품부)의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구이다.

REFERENCES

- Lee BH, Choi BW, Chun JH, Yu BS. 1996. Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds. *J Korean Ind & Eng Chem* 7: 1069-1077.
- Papa S, Skulachev VP. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 174: 305-319.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York, NY, USA. p 246-350.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
- Bae SM, Kim JH, Cho CW, Jeong TJ, Ha JU, Lee SC. 2001. Effect of microwave treatment on the antioxidant activity of rice processed by-products. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1026-1032.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16: 33-50.
- Morrissey PA, O'Brien NM. 1998. Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J* 8: 463-472.
- Yoon WY, Lee JA, Kim KN, Kim JY, Park SY. 2007. *In vitro* anti-inflammatory activity of the *Artemisia fukudo* extracts in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Korean J Food Sci Technol* 39: 464-469.
- Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth

- D, Hammer C. 1994. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. *Transpl Int* 7: S647-S649.
10. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7773-7777.
 11. Nishida T, Yabe Y, Fu HY, Hayashi Y, Asahi K, Eguchi H, Tsuji S, Tsujii M, Hayashi N, Kawano S. 2007. Geranylgeranylacetone induces cyclooxygenase-2 expression in cultured rat gastric epithelial cells through NF- κ B. *Dig Dis Sci* 52: 1890-1896.
 12. Cheon YP, Mohammad LM, Park CH, Hong JH, Lee GD, Song JC, Kim KS. 2009. *Bulnesia sarmienti* aqueous extract inhibits inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J Life Sci* 19: 479-485.
 13. Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Choi SW. 2011. Anti-inflammatory effects of volatile flavor extract from herbal medicinal prescriptions including *Cnidium officinale* Makino and *Angelica gigas* Nakai. *J Soc Cosmet Sci Korea* 37: 199-210.
 14. Hyun MR, Lee YS, Park YH. 2011. Antioxidative activity and flavonoid content of *Chrysanthemum zawadskii* flowers. *Korean J Hort Sci Technol* 29: 68-73.
 15. Jang MJ, Rhee SJ, Cho SH, Woo MH, Choi JH. 2006. A study on the antioxidative, anti-inflammatory and anti-thrombogenic effects of *Zanthoxylum piperitum* DC. extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 21-27.
 16. Ayam VS. 2011. *Allium hookeri*, Thw. Enum. A lesser known terrestrial perennial herb used as food and its ethnobotanical relevance in Manipur. *Afr J Food Agric Nutr Dev* 11: 5389-5412.
 17. Kim KH, Kim HJ, Byun MW, Yook HS. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extract from six vegetables containing different sulfur compounds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 577-583.
 18. Vazquez-Prieto MA, Miatello RM. 2010. Organosulfur compounds and cardiovascular disease. *Mol Aspects Med* 31: 540-545.
 19. Bae GC, Bae DY. 2012. The anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Allium hookeri* cultivated in South Korea. *Kor J Herbol* 27: 55-61.
 20. Blois M. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 21. Nishikimi M, Appaji N, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 849-854.
 22. Fridovich I. 1970. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 245: 4053-4057.
 23. Korycka-Dahl M, Richardson T, Hicks CL. 1979. Superoxide dismutase activity in bovine milk serum. *J Food Prot* 42: 867-871.
 24. Cheng ZJ, Kuo SC, Chan SC, Ko FN, Teng CM. 1998. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim Biophys Acta* 1392: 291-299.
 25. Heo SJ, Yoon WJ, Kim KN, Ahn GN, Kang SM, Kang DH, Affan A, Oh C, Jung WK, Jeon YJ. 2010. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol* 48: 2045-2051.
 26. Ren K, Torres R. 2009. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res Rev* 60: 57-64.
 27. Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M. 2003. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J Plant Physiol* 160: 1025-1032.
 28. Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadota S. 2001. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. *J Ethnopharmacol* 77: 209-217.
 29. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. 1994. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3228-3232.
 30. Hyun EA, Lee HJ, Yoon WJ, Park SY, Kang HK, Kim SJ, Yoo ES. 2004. Inhibitory effect of *Salvia officinalis* on the inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthesis in murine macrophage RAW 264.7. *Yakhak Hoeji* 48: 159-164.
 31. Kim EY, Moudgil KD. 2008. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. *Immunol Lett* 120: 1-5.
 32. Kim JH, Bachmann RA, Chen J. 2009. Interleukin-6 and insulin resistance. *Vitam Horm* 80: 613-633.